

非标记探针 HRM 法在中国对虾 EST-SNP 筛选中的应用

吴莹莹¹ 孟宪红² 孔杰^{2*} 王清印² 栾生² 罗坤²

(¹山东省海水养殖研究所, 青岛 266002)

(²农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 利用高分辨率溶解曲线(High resolution melt, HRM), 结合非标记探针技术, 对中国对虾转录组 EST 测序序列中的 118 个候选 SNP 位点进行了位点多态性检测, 获得了 39 个具有二等位基因多态性的 SNP 位点, 占总候选位点的比例为 33.1%。对这些 SNP 位点在一个 48 尾中国对虾群体中的多态性进行了分析, 结果表明, 观测杂合度 H_o 和期望杂合度 H_e 的分布范围分别为 0.000~0.947 和 0.049~0.506, 有效等位基因数分布范围为 1.051~1.999, 平均为 1.574; 多态信息含量分析显示 39 个位点的 PIC 值范围为 0.047 6~0.375, 平均为 0.272。另外, 基因功能注释表明, 39 个多态 SNP 所在 contig 序列所对应的基因大都与免疫相关。以上这些结果表明, 非标记探针 HRM 是一种简单快速而有效的 SNP 开发技术, 可为中国对虾群体遗传学和遗传育种分析提供有效的候选标记。

关键词 中国对虾 单核苷酸多态性 高分辨率溶解曲线

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)01-0111-08

Application of unlabeled probe by HRM in development of EST-SNPs in *Fenneropenaeus chinensis*

WU Ying-ying¹ MENG Xian-hong² KONG Jie^{2*}

WANG Qing-yin² LUAN Sheng² LUO Kun²

(¹ Marine Institute of Shandong Province, Qingdao 266002)

(² Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT In *Fenneropenaeus chinensis*, 118 SNPs were selected for validation using high resolution melting (HRM) assays with unlabeled probes, in which 39 (33.1%) loci were polymorphic. Polymorphism of these 39 distinct loci was assessed using 48 individuals, and the results showed that the values of N_e , H_o , H_e and PIC varied from 1.051 2 to 1.999, from 0.000 to 0.947, from 0.049 to 0.506, from 0.049 to 0.506, respectively. The 39 contigs, to which 39 loci belonged, were annotated with Nr database. The annotation showed that, most correspond-

国家自然科学基金项目(31072206;31172402)、青岛市关键技术攻关项目(11-1-1-11-hy)共同资助

* 通讯作者。E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-11-30; 接受日期: 2013-01-21

作者简介: 吴莹莹(1981-), 女, 博士, 主要从事海水养殖品种的繁殖生物学和遗传育种研究。E-mail: yingyingwu9688@126.com,

Tel: 13864800400

ing genes were associated with immunity. The results indicated that unlabeled HRM is a simple, rapid and efficient method for SNP genotyping. These polymorphic markers will be useful genetic tools in the population genetics and breeding programs for *Fenneropenaeus chinensis*.

KEY WORDS *Fenneropenaeus chinensis* Single nucleotide polymorphisms(SNP)
High resolution melting(HRM)

单核苷酸多态性(SNP)是基因组中最常见的变异形式(Brookes *et al.*, 1998),在基因组中的分布频率很高,并往往和特定的性状关联(Kang *et al.*, 2002),因此成为当前水产生物遗传多样性分析、遗传育种等研究领域应用广泛的分子标记。目前报道的 SNP 检测方法很多,常用的技术有单核苷酸引物延伸(Single nucleotide primer extension)(Syvanen *et al.*, 1990)、单链构象多态性(SSCP)(Orita *et al.*, 1989)、TaqMan 探针技术(Livak 1999)、变性高效液相色谱(DHPLC)(O'Donovan *et al.*, 1998)等。但这些方法都存在一些缺点和不足,主要表现为检测过程繁琐、检测所用时间长、试剂昂贵等,从而不利于在生产中推广应用。目前,高分辨率熔解曲线技术(High-resolution melting, HRM),因其速度快、高通量、价格低廉,真正实现了闭管操作等优点,越来越多地受到国内外广大研究者的关注(Garritano *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2004)。

中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 是我国最具代表性的水产养殖种类之一,已先后培育“黄海1号”和“黄海2号”两个新品种,其中“黄海2号”具有一定程度抗白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)的特性,但由于 WSSV 等对虾类病毒具有发病快、传染率高等特点,仍需加强具有更突出抗病优势新品种培育的力度。孟宪红(2010)通过分析中国对虾 WSSV 抗性的遗传力,推断中国对虾的抗病性可能由少数几个基因决定,因此对中国对虾进行高强度 WSSV 性状选择时,最后存活的少量个体有可能携带抗性基因,同时也预示着采用分子标记辅助选择育种(MAS)的可能性。与此同时,如果某个基因在生物的生长或抗病等方面起着重要作用,一般其不同的 SNP 所代表的各基因型相应也会表现出一定的生物学功能差异(王卓等 2008;刘福平等 2009;唐永凯等 2010)。因而在中国对虾基因组内挖掘 SNP,并通过 SNP 定位抗病相关基因对于中国对虾的遗传育种有着重要而积极的意义。本研究在中国对虾转录组 454 高通量测序 GS FLX 系统大规模测序的基础上,依据预测的 SNP 位点设计引物,通过非标记探针 HRM 技术进行候选 SNP 位点多态性的验证,以期建立简便快捷的中国对虾 SNP 分型方法,为中国对虾遗传图谱构建、重要性状 QTL 定位及其分子标记辅助选择打下基础,为 SNP 在中国对虾遗传学研究及遗传育种中应用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用中国对虾取自中国水产科学研究院黄海水产研究所鳌山卫水产遗传育种中心(2009年8月),从约100个养殖家系中随机挑选,共48尾。DNA提取自中国对虾尾部肌肉,采用酚/氯仿抽提,乙醇沉淀,紫外分光光度计定量,−20℃保存备用。具体操作参照石拓等(1999)的方法。

1.2 EST-SNP 的查找和引物、探针的设计

中国对虾转录组 454 高通量测序、contig 的拼装和 SNP 位点的预测由国家人类基因组南方研究中心完成。根据中国对虾 454 高通量测序系统 GS FLX 大规模测序的结果推断候选 SNP 位点。利用引物设计网站的引物在线设计程序进行引物设计。引物长度控制在 20bp 左右,产物片段大小控制在 60~110bp 以内。通过 Primer Premier 5.0 检查引物质量,不能有严重错配、引物二聚体和发夹结构等。针对每个候选 SNP 位点,设计一条长 19~35bp 的未标记探针,使突变位点位于探针中心, T_m 值介于 59~61℃(T_m 值可用在线程序 <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> 进行估计),探针 3' 末端用两个错配碱基封闭。引物和探针均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 引物验证和位点多态性检测

随机选取 30 个对虾个体 DNA 等量混合作为模版 DNA,进行引物验证。实验采用 10 μ l 体系的不对称 PCR(20 ng 模版 DNA,0.1 μ mol/L 正向引物,0.5 μ mol/L 反向引物,1.5 μ mol/L MgCl₂,2.0 mmol/LdNTP,1U r TaqDNA 聚合酶,1 \times LC Green Plus 染料),95 $^{\circ}$ C 变性 5min 之后,进行 55 个循环扩增(95 $^{\circ}$ C 40s,60 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 40s),最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。2%琼脂糖电泳检测扩增产物。

根据电泳结果,选择产生大小符合预期、单一条带 PCR 产物的位点进行探针的检测并对混合家系群体进行分型,PCR 反应体系如前所述。扩增反应结束后,在超净工作台上对每个反应添加相应引物的探针至终浓度 2.0 mmol/L,95 $^{\circ}$ C 变性 5min 后 25 $^{\circ}$ C 复性 30s。HRM 分析利用 LightScanner 仪器(美国 Idaho 公司)进行,以 0.1 $^{\circ}$ C/s 的速率缓慢从 40 $^{\circ}$ C 升温至 95 $^{\circ}$ C,以 0.1 $^{\circ}$ C 的分辨率采集荧光信号,采用 LightScanner 软件进行荧光信号的分析处理。

1.4 遗传参数估计

利用对混合家系群体的分型结果采用 POPGEN32(Version 1.32)软件进行处理,估算 SNP 位点的主要遗传学参数。纯合子分别记为 AA 和 BB,杂合子记为 AB,统计各位点的有效等位基因数(Effective number of alleles, N_e)、期望杂合度(Expected heterozygosity, H_e)、观测杂合度(Observed heterozygosity, H_o),统计家系基因型分布及其频率和最小等位基因频率(Minor allele frequency,MAF)。用 PIC_CALC(0.6)计算各位点多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)。

2 实验结果

2.1 引物验证及非标记探针 HRM 分型

根据 SNP 位点侧翼序列的保守性和位点分布频率,选取 118 个位点设计引物。其中 83 个位点产生符合预期产物大小的单一条带。对这 83 个位点设计并合成探针,并利用 1 个随机群体的 48 个个体进行非标记探针 HRM 分型。结果显示,其中 23 个位点(19.5%)无法准确分型,另 21 个位点(17.8%)在检测群体中无多态性,只有 39 个位点(33.1%)可以明显区分出两种不同的基因型位点。39 个位点的引物和探针序列等信息见表 1。

表 1 中国对虾 39 个多态 SNP 位点信息
Table 1 Detailed information of 39 SNP loci

位点名称 Locus name	引物序列 Sequence(5'→3')	产物大小 Amplicon size(bp)	N_e	H_o	H_e	PIC	MAF
C26-2977GA	F: TCAACATGTGACTTCGGGTATC R: CGTTCCCTGTACTTGCATT Pb:GAATTCTTTACCCTGGCTCAGTATAAAAGCAGgt	106	1.406	0.100	0.292	0.247	0.175 0
C283-145AG	F: ATCACGGCCCCAAAGAAC R: ACGTAAACCACTCGGAATGC Pb: TCCCCGTGTAACATGAACACCtg	80	1.761	0.421	0.438	0.339	0.315 8
C364-89AT	F: AGGAAACAGTACAAGTGTCTGGTATTT R: AGGGAAGGAAAAATGAGGCATA Pb: ATCAAAAAGTTAGACTCATCATCAGAta	101	1.724	0.600	0.425	0.332	0.300 0
C732-151GA	F: ATCCGATGGCGTGACTTAT R: TGTCTTCGTCGCTCAAACAG Pb:CGAATCTCTGCGTTTTTGGAAATTcc	69	1.969	0.525	0.498	0.371	0.437 5
C732-412AG	F: GTGAACCCGGGAGACTGTAA R: AGGGCACACAAGTTGGGATA Pb: CCGGGAACATAATCCTGTGTGCGtt	92	1.988	0.290	0.504	0.373	0.460 5

续表 1

位点名称 Locus name	引物序列 sequence(5'→3')	产物大小 Amplicon size(bp)	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	<i>MAF</i>
C760-261AT	F: CCATCTCGGCACAAGAATTT R: GCTGAATCCTCCACGAAGTT Pb: AGGTTGCTCTTGATGATTACAGCCTtg	74	1.742	0.000	0.432	0.335	0.307 7
C9138-1735GC	F: TCCCTGATGTACCAAGTTTCG R: TGC ACTCTCGAATTCCTCAA Pb: CTTGGGAGGTGGAGACTCTGGACaa	92	1.995	0.650	0.505	0.374	0.475 0
C990-158CT	F: TGACTGGCATTATGCTCTGC R: ATCCTCTTGGCGAACATAGC Pb: AATTGCGCCTGCTTTAAGTCAAGtc	93	1.995	0.650	0.505	0.374	0.475 0
C1004-189GA	F: CCCAATGAAACAAAGTTCC R: TCCGGAGGAGGACTGCTG Pb: CAGGTGAAGATGCACGGACTATcc	95	1.418	0.103	0.298	0.251	0.179 5
C1463-239AG	F: CCTTGTGGGAGCAGTCCTT R: CGAGCTCCGTCTCCAGAGT Pb: GCCATGGACGCCAAGGACTTCGGGtg	63	1.941	0.375	0.491	0.367	0.412 5
C1667-112CT	F: TGGACAGACTCACGGATGC R: GAATGGTTGGAATGTAACCTCA Pb: GTATAATCTAACATCAGCAGGTCac	110	1.220	0.200	0.182	0.164	0.100 0
C2267-202TG	F: CTCAAGGACCCACGTTTGT R: CGTCCCCTGTATTTCGTTAT Pb: AATTGCCTGAGATTCTATGATCGGAag	87	1.133	0.125	0.119	0.110	0.062 5
C2635-527CA	F: GAGGAGACTTCGCTCGACAC R: AACGTCCAACACCCATTCAT Pb: GAAGACTTGAAGAACAAGAGCAAGAGCAAgg	96	1.919	0.436	0.485	0.364	0.397 4
C2637-182AT	F: TCATCACCTCCGTACACCTG R: TCAGACTGGGCAACAACAAG Pb: GGCTTCTTGTGTACTTGTAGGTCTCGgt	99	1.600	0.450	0.380	0.305	0.250 0
C2958-131GT	F: GCAGTGGACAACACACCAAT R: AGGCATAATTAGCCGCTGTG Pb: ACACCCAGACGCCCCATGGTtg	85	1.730	0.342	0.428	0.333	0.302 6
C2958-191CT	F: TACCCAGGACAGCCTAACCA R: ATCTTCCGGTCATTGTACAG Pb: TATGCCTGTCTTTACACACCTGACTTCATGaa	95	1.800	0.615	0.450	0.346	0.333 3
C3040-180GT	F: GCGACCTTCGTCAAATGTAAA R: ATAGAGAATGGAGGCGCTGA Pb: CCGTTGTTGTCTGTATGAGGCCAGGgt	99	1.995	0.947	0.505	0.374	0.473 7
C3143-100AT	F: GAGAATCGGATGTACTCATTAAAGG R: GACTCCCTGCATGTTGATCC Pb: TCAAGATACCCAGATGAGCCTCCAAATAaa	99	1.5355	0.250	0.353	0.288	0.225 0
C3488-75AT	F: ATCGTCAAGCAAGCGAAGA R: GTGGAATGACCCTTGAGGAG Pb: ACATCATCTTCTACCTCGGGACGGet	95	1.430	0.368	0.305	0.255	0.184 2
C3544-79AT	F: TTCTGGTCGTCGTATCGTATGT R: TCCCAAATCATGTGGAGCTT Pb: AGTCATCCTTGTTATATCATAGTCACCAGTc	107	1.517	0.180	0.345	0.283	0.217 9
C3704-100AG	F: TGATTGACCCTCTTCTCCT R: AATCTGCTGTTGGAGATGACC Pb: CTTCTCTCATCCAAGGTTGAGGAGTTTcc	86	1.532	0.342	0.352	0.287	0.223 7
C3996-984TA	F: ATGGCCTGACCTTCACTGAG R: GCCCTTGGCAACCTTATCTT Pb: ACACCTCAACACTGAGGTTGCCATTct	83	1.190	0.075	0.162	0.147	0.087 5
C4115-374AC	F: CCTCATGGATCAGGCCTTC R: TTACCGTCTGAGCCTCGTA Pb: CGCTACATCAAGGAAAATAAGGGCATCct	87	1.999	0.775	0.506	0.375	0.487 5

续表 1

位点名称 Locus name	引物序列 sequence(5'→3')	产物大小 Amplicon size(bp)	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	MAF
C5111-135CA	F: GTTGAAACTCAGCGAGACCAG R: GCTTCCCTTGTTCACAGCTC Pb:GGGAAACTGATCAAGCTTGTGTCATATAAGat	109	1.296	0.263	0.232	0.202	0.131 6
C5716-174CT	F: TCTTGAAGTGTGTTTCATTTCATGTTT R: AACGCTTTGTGTCGTCTCCT Pb:GTAAGTGTACATGACGATTACTCTTTCCcta	101	1.616	0.513	0.386	0.309	0.256 4
C6014-223TC	F: GCGACCTAAAAAGGTAGCACAC R: CCTCCACACATACCCAAAGACT Pb:CAGAAGGACGCTTACGTCGGCGAac	107	1.352	0.256	0.264	0.226	0.153 8
C6781-218TC	F: GCGACCTAAAAAGGTAGCACAC R: CCTCCACACATACCCAAAGACT Pb:CAATAAGGGCAATCTTGGCTTCATAACTTag	102	1.084	0.081	0.079	0.075	0.040 5
C7348-158TA	F: AGCTGACATCACTAGCCATGAA R: GATGAACGCGTGTGTTGAAGA Pb:GATTGAAGACCTTAACTTGGATGTGCTTAAAGTat	95	1.166	0.051	0.144	0.132	0.076 9
C7533-110AG	F: TGCTCTTGCTCTTGAGTCCA R: GCAAGGCTGGTATGAAGG Pb:TCTCTGTAGGCAACCCTTCCACCACac	93	1.968	0.615	0.498	0.371	0.435 9
C8257-215TG	F: GTGGCCTACGAAGGAGAGTG R: GCTCGACAAGTTGGAGTAAG Pb:ACTTACTCCAAGTGTGCGAGCTGGgt	103	1.105	0.000	0.096	0.0905	0.050 0
C8646-733TC	F: ACGTGAAATCGTTCGTGACA R: AGAGGAAGCAGCAGCAACAT Pb:AGCTTTGCTACATTGCCCTTGACTTCGtc	88	1.051	0.050	0.049	0.0476	0.025 0
C9672-115CT	F: CGATTCATGGATGCAGACAC R: TGGCTCGGTCTGTAAACT Pb:CATCTACGGACGCCACAGCAGTTTCCACga	80	1.568	0.475	0.367	0.297	0.237 5
C9971-128CT	F: GCATATCCTGCGTTTGATGA R: TGAGGACAATGTTGGAGTAACG Pb:CGTAAGGTTATGTTCCGCATGACTTCCAag	107	1.772	0.487	0.441	0.341	0.320 5
C10199-423CA	F: GCCCAAAGTGATCAAGAAGTG R: AGCCTTCCAGCAAGAGTCTG Pb:GTGACTGTTCCCTCTATTTAAGAGGTCCgg	106	1.078	0.075	0.073	0.0696	0.037 5
C10572-325GA	F: TGGTACCACCAGACATGACG R: ATTCAGGAAACCGTCCACAG Pb:GTCCTTCTGATGTCAATGTCGCACga	91	1.600	0.500	0.380	0.305	0.250 0
C12355-190GA	F: AACTTTGCCAAGGCTGCATA R: CCGTGAAGTCTGTTAGGG Pb:CCTATGCTTACCTGACACCAGATCTCTGet	109	1.663	0.450	0.404	0.319	0.275 0
C12355-421GA	F: TTGCTATCGGTGACTACAATGG R: GAGAGCTTGGCAAGAATGATG Pb:GTCTTGGTGTAAGTGCAGCAAGGAAGTcc	100	1.600	0.450	0.380	0.305	0.250 0
C12355-592CT	F: GGGTCTGTTATGGTGCCTCT R: AGAGCTTCTTGGGAACAGAGG Pb:TCCAGCTCCCCGTGGTACTGcg	76	1.568	0.325	0.367	0.297	0.237 5
C13092-238GA	F: ACAGCAAAACGTCCAAGAGG R: TGGTGAAGTCTGCATGTAA Pb:ATACTGTTGGAAGGTCTCCACGCACta	90	1.374	0.325	0.276	0.235	0.162 5

图 1 为位点 C1463-239AG 的群体分型结果。其中灰色样品为纯合峰,峰值较高, T_m 值约为 72°C , 为 G/G 型;蓝色样品也是纯合峰,峰值较低, T_m 值约为 69°C , 为 A/A 型;红色样品为杂合峰,为 A/G 型。表 1 为经过验证的 39 个 SNP 位点的详细信息,包括正反向引物和探针的序列,SNP 类型及产物长度等。

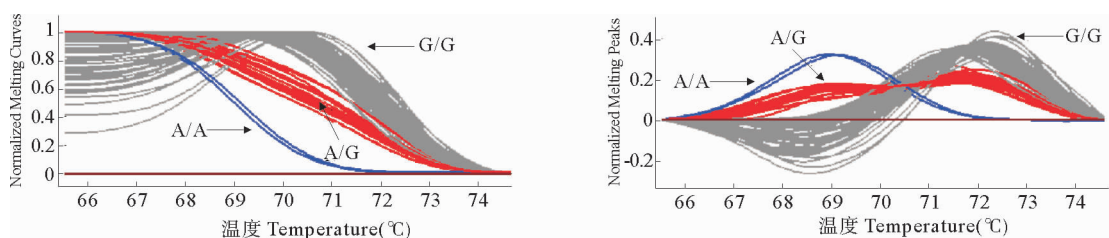


图1 C1463-239AG 位点的分型结果

Fig. 1 Unlabeled probe genotyping of C1463-239AG

2.2 SNP 位点的群体多样性分析

利用上述 39 个 SNP 位点对 48 个个体组成的混合养殖家系群体进行遗传多样性分析。因为 SNP 位点为两等位基因类型,因此每个 SNP 位点的等位基因数目均为两个。分析数据显示观测杂合度的分布范围为 0.000~0.947,期望杂合度的范围为 0.049~0.506,有效等位基因数分布范围为 1.051~1.999,最小等位基因频率分布范围为 0.025~0.487 5(表 1)。多态信息含量分析显示 39 个位点的 PIC 值范围为 0.047 6~0.375,其中 12 个位点属于低度多态($PIC < 0.25$),其余 27 个位点属于中度多态($0.25 < PIC < 0.5$)。

2.3 SNP 位点序列的功能分析

利用 NCBI 的 BLASTX 程序,对 39 个多态 SNP 对应的 contig 序列进行了功能注释(表 2)。其中,28 个序列找到了疑似与其具有同源性的目的基因,这些基因大都与免疫相关,如雪蓝蛋白(Hemocyanin)、雪蓝蛋白亚基 L(Hemocyanin subunit L)、氧合酶(Oxygenase)、假定 Kazal 型蛋白酶抑制剂(Hepatopancreas kazal-type proteinase inhibitor)、hepatopancreas kazal-type proteinase inhibitor 1A1)等。

表 2 对序列预测蛋白的基因注释信息

Table 2 Gene annotation of predicted proteins of the contigs

Query name	Contig 长度(bp)	推定功能 Putative function
Contig26	3 434	Putative ficolin 推定的纤维胶凝蛋白
Contig283	269	Effector caspase 天冬氨酸蛋白水解酶效应子
Contig364	332	Putative CG2930-PD
Contig732	636	Hepatopancreas kazal-type proteinase inhibitor
Contig760	533	BGBP_PENVA Beta-1,3-glucan-binding protein precursor (β GBP)
Contig990	254	Putative CG5190-PA
Contig1004	281	Putative importin beta-3 假定输入蛋白 β -3
Contig1463	319	Conserved hypothetical protein [Toxoplasma gondii GT1]
Contig1667	337	Putative ficolin 推定的纤维胶凝蛋白
Contig2267	247	Hypothetical protein SSE37_08583 假定蛋白 SSE37_08583
Contig2637	433	GLNA_PANAR Glutamine synthetase (Glutamate-ammonia ligase)
Contig3040	300	Hemocyanin 血蓝蛋白
Contig3143	344	Putative Uev1A CG10640-PA, isoform A isoform 1
Contig3488	256	A chain A, crystal structure of shrimp alkaline phosphatase pdb
Contig3544	328	Ovarian peritrophin 卵巢围食膜因子
Contig3704	259	Putative G1/S-specific cyclin-C 假定 G1/S 特异的细胞周期蛋白 C
Contig3996	1 148	Conserved hypothetical protein 保守的假定蛋白
Contig5111	360	Oxygenase 氧合酶
Contig5716	273	Putative ENSANGP00000022750

续表 2

Query name	Contig 长度(bp)	推定功能 Putative function
Contig6014	1 577	Hemocyanin subunit L 血蓝蛋白亚基 L
Contig6781	300	Putative MGC81821 protein 假定 MGC81821 蛋白
Contig7533	255	AGAP004984-PA
Contig8257	811	Hepatopancreas kazal-type proteinase inhibitor 1A1 假定 kazal 型蛋白酶抑制剂 1A1
Contig8646	881	Conserved hypothetical protein 保守的假定蛋白
Contig9138	2 254	Hemocyanin subunit L 血蓝蛋白亚基 L
Contig9971	822	Ribosomal protein S18
Contig10572	1 359	Putative ENSANGP00000010572
Contig12355	907	Unnamed protein product

3 讨论

HRM 是最新兴起的、低成本和操作简单的高通量突变扫描和基因分型技术。该技术在 PCR 结束后直接运行高分辨率熔解,通过饱和染料监控核酸的熔解过程得到特征的熔解曲线,再根据熔解曲线的变化来判断核酸性质的差异(黄 好等 2007)。但是,无义突变和碱基变化的类型等使熔解曲线的分析变得比较复杂。为降低溶解曲线的复杂性,在 HRM 的基础上又推出了非标记探针 HRM。未标记探针是一段 3'端被封闭的小片段核苷酸,一般在 20~35 bp 之间,涵盖了与靶基因上的突变、缺失、错配区域互补部分(Margraf *et al.* 2006)。加上探针长度较短,进一步提高了辨别不同样品之间的分辨率,使不同的纯合子样品可以被准确地鉴定出来。除此之外,非标记探针不需荧光标记,只需对 3'端进行封闭,因此价钱低廉。标准的非标记探针法,探针是在 PCR 反应前加入,实现了真正的闭管操作,不会对样品造成任何污染,同时也使操作更加方便快捷。

本研究运用非标记探针 HRM 技术,在中国对虾转录组 454 高通量 GS FLX 系统大规模测序的基础上,依据预测的 SNP 位点设计引物和非标记探针,验证了 39 个具有多态性的 SNP 位点。本研究是非标记探针 HRM 技术在中国对虾遗传多态性分析中的首次应用,结果表明运用非标记探针 HRM 法在优化后的非对称 PCR 反应条件下,可以快速、有效地对中国对虾 SNP 位点进行验证和基因分型。在中国对虾 SNP 分型研究方面,已经有了几种不同的应用方法,如张建勇等(2011)采用四引物扩增受阻突变体系 PCR(Tetra-primer ARMS-PCR)技术,对中国对虾的 80 个 SNP 位点进行验证,结果显示 ARMS-PCR 是一种简单快速而有效的 SNP 基因分型方法,但对监测位点要求较高,且很容易受到 PCR 条件的影响;高 焕等(2011)在研究了 3 种抗菌肽基因应答 WSSV 浸染的表达式的基础上,运用 SSCP 技术对各类型中国对虾抗菌肽的 SNP 位点进行了筛选,进一步对不同 SNP 类型与抗 WSSV 或易感 WSSV 的关联程度进行了分析。SSCP 方法的优点在于简单快速,但同时具有不能确定突变类型和具体位置的弊端。在实际的应用中,可以结合研究目的和实验室现有条件,选择合适的 SNP 标记筛选方法。

本研究利用开发的 39 个具有多态性的 SNP 位点,对一个混合家系养殖群体进行了遗传多态性分析。对 SNP 分型数据进行分析,平均有效等位基因数为 1.574,观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量分别为 0.000~0.947、0.049~0.506 和 0.047 6~0.375。对比显示,SNP 标记揭示的群体多样性指数,如观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量等均低于 SSR 标记(刘 萍等 2004)分析的结果,这是因为 SNP 标记为双等位形式,每个位点所携带的多态信息较少。

本研究用候选 SNP 位点均为来自编码区的 Mis-sence 位点,即这类 SNP 的产生造成了氨基酸的改变。对这些 SNP 位点所在的基因功能注释表明,这些基因绝大多数都是机体参与免疫防御功能的基因,因此对这些 SNP 位点的开发,有利于找到中国对虾抗病相关的基因,为阐明中国对虾抗 WSSV 的遗传机理提供指导方法,进而推动中国对虾分子标记辅助育种工作的进程。

参 考 文 献

- 王 卓, 咎林森. 2008. 秦川牛 H-FABP 基因第 1 外显子 SNP 及其与部分肉用性状相关性的研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 36(11): 11-15
- 石 拓, 孔 杰, 刘 萍, 韩玲玲, 庄志猛, 邓景耀. 1999. 用 RAPD 技术对中国对虾遗传多样性分析——朝鲜半岛西海岸群体的 DNA 多态性. 海洋与湖沼, 30(6): 609-616
- 刘 萍, 孟宪红, 孔 杰, 庄志猛, 马春艳, 王清印. 2004. 中国对虾微卫星 DNA 多态性分析. 自然科学进展, 14(3): 333-338
- 刘福平, 白俊杰, 叶 星, 李胜杰, 李小慧, 于凌云. 2009. 罗非鱼 MC4R 基因克隆及其与生长相关的 SNPs 位点. 中国水产科学, 16(6): 817-823
- 张建勇, 王清印, 王伟继, 孟宪红, 孔 杰, 张全启. 2011. 四引物扩增受阻突变体系 PCR 技术在中国明对虾 SNP 基因分型中的研究. 中国水产科学, 18(4): 751-760
- 孟宪红. 2010. 中国对虾“黄海 2 号”对 WSSV 的抗病性分析. 见: 中国海洋大学博士研究生学位论文
- 唐永凯, 李建林, 俞菊华, 陈雪峰, 李红霞. 2010. 吉富罗非鱼 MSTN 基因结构及其多态性与生长性状的相关性. 中国水产科学, 17(1): 44-51
- 高 焕, 赖晓芳, 孟宪红, 罗 坤, 孔 杰. 2011. 中国明对虾抗菌肽基因应答 WSSV 浸染的表达及其 SNP 分析. 中国水产科学, 18(3): 646-653
- 黄 好, 黄国庆. 2007. 高分辨率熔解—SNP 及突变研究的最新工具. 生命的化学, 27(6): 573-576
- Brookes A, Day I. 1998. SNP attack on complex traits. Nat Genet 20 (3) : 217-218
- Garritano S, Gemignani F, Voegelé C and 6 others. 2009. Determining the effectiveness of high resolution melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. BMC Genomics 10: 1-12
- Kang JH, Lee SJ, Park SR, Ryu HY. 2002. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *paralichthys olivaceus*. Fish Sci 68: 494-498
- Margraf RL, Mao R, Wittwer CT. 2006. Masking selected sequence variation by incorporating mismatches into melting analysis probes. Human Mutation 27: 269-278
- Zhou L, Myers AN, Vandersteen JG and 2 others. 2004. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. Clinical Chemistry 50(8): 1328-1335
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H and 2 others. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 86(8): 2766-2770
- O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC and 7 others. 1998. Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. Genomics 15, 52(1) : 44-49
- Syvanen AC, Aalto-Setälä K, Harju L and 2 others. 1990. A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. Genomics 8(4) : 684-692